

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО С-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТЕ МУРАМОИЛДИПЕПТИДОВ

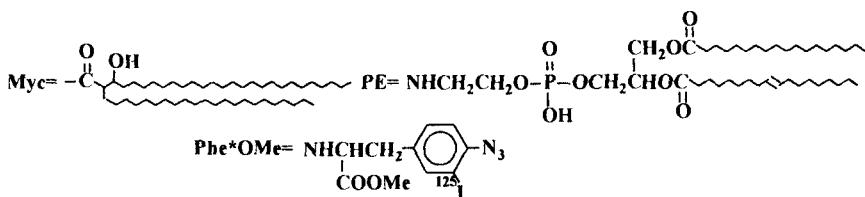
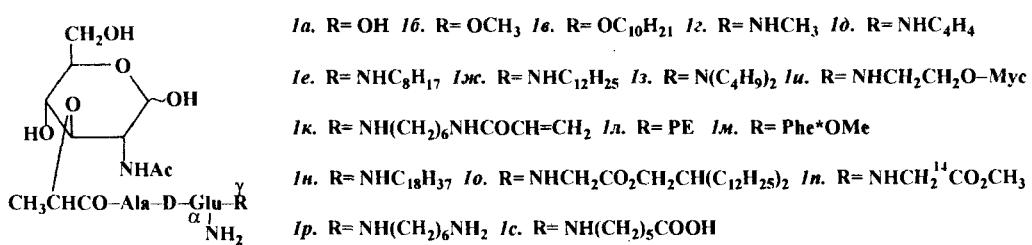
Землякое А. Е., кандидат химических наук, доцент

Молекула N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (мурамоилдипептид, МДП, *1a*), являющаяся минимальным адьювантоактивным фрагментом пептидогликана клеточных стенок микробактерий [1], удобна для получения производных как по углеводному фрагменту, так и по аминокислотным остаткам. Модификация молекулы МДП позволяет в деталях изучить взаимосвязь структуры мурамоилдипептида с биологической активностью, а также получить гликопептиды более активные по сравнению с самим МДП.

Исследования пептидных аналогов МДП показали, что если N-концевая аминокислота (аланин) может быть заменена без потери активности на ряд других аминокислот [2-7], в том числе, L-валин [5,6], L-серин [2,3,8,9] или L- α -аминоизомасляную кислоту (Aib) [5,6], то C-концевая аминокислота может быть представлена только D-глутаминовой кислотой (*2a*) [2,4,8,10,11] или ееmonoамида: D-глутамином (γ -амид, *3a*) [11,12] или D-изоглутамином (α -амид, МДП, *1a*). Наличие свободных карбоксильных групп в этих аминокислотах открыло широкие возможности для дополнительной модификации мурамоилдипептида. В наших исследованиях по синтезу и изучению биологической активности гликопептидов – аналогов МДП также значительное место занимают производные мурамоилдипептида по глутаминовому остатку. Рассмотрим три группы подобных аналогов МДП, отличающиеся структурой второй аминокислоты.

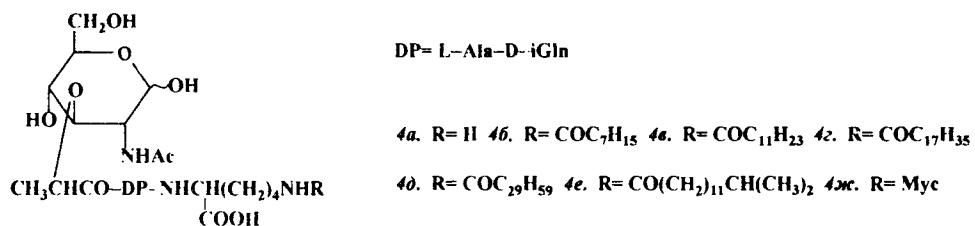
Производные МДП по остатку изоглутамина.

γ -Карбоксильная группа N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина легко превращается в сложный эфир или амид как на стадии получения дипептида, так и в готовом гликопептиде.

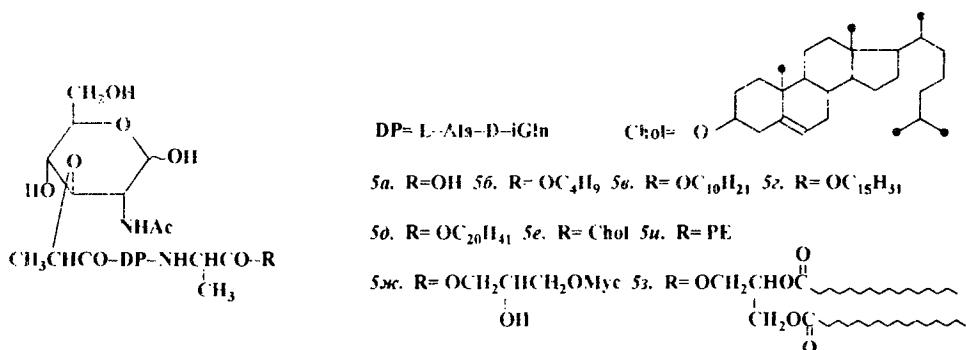


По первому варианту были получены γ -метиловый (*1b*) [2,8] и γ -дециловый (*1c*) [13] эфир МДП, а также γ -метил- (*1g*) [8], γ -бутил- (*1d*) [14,15], γ -октил (*1e*), γ -додецил (*1j*) и γ -дибутил (*1z*) амиды

[15] МДП, миколевый эфир этаноламида МДП (*1u*) [16]. По второй схеме синтезированы 6-N-акрилоиламиногексаметиленамид (*1k*) [17] и фосфатидилэтаноламид (*1l*) [18] мурамоилдипептида.

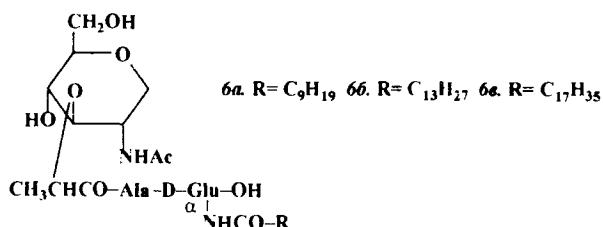


Так как биологические испытания показали, что третья аминокислота (глицин, L-аланин, L-лизин и т.п.) не влияет на активность гликопептидов [4,14], то была синтезирована большая группа мурамилтрипептидов модифицированных по третьей аминокислоте. В частности, описан синтез МДП-L-лизина (*4a*) [19], ацилированного по ω -аминогруппе линейными (*4b-д*) [20], ω -разветвленной (*4e*) [20] и природной миколевой (*4ж*) [16] кислотами, и МДП-L-аланина (*5a*) [19], этирифицированного линейными спиртами (*5б-д*) [13], холестерином (*5e*) [21], миколевым эфиром глицерина (*5ж*) [13], дипальмитиновым эфиром глицерина (*5з*) [22], или конденсированного с фосфатидилэтаноламином (*5u*) [22], а также ¹²⁵I-меченого метилового эфира МДП-(*и*-иод-*п*-азидо)-L-фенилаланина (*1m*) [23].



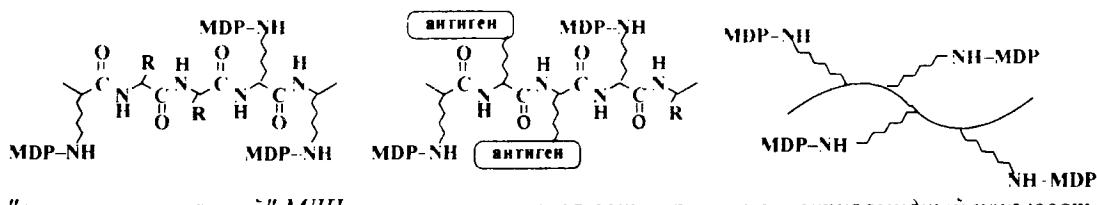
Комбинация гликопептида с высоколипофильным компонентом часто обеспечивает высокую биологическую активность. Например, МТП-глицерилмиколат (*5ж*) – мощный стимулятор неспецифической резистентности к бактериальным инфекциям [22,24], МТП-миколат (*4ж*) и МДП-амидоэтанолмиколат (*1u*) являются сильными адьювантами [16,22], МТП-холестерин (*5e*) проявляет высокое противоопухолевое действие [22,25,26]. Препарат «ромуртид» (химические названия «муроктазин», МДП-L-лизин-L18 или МТП-стеароил (*4г*)) – первый синтетический гликопептид, разрешенный к медицинскому применению в качестве лекарства, восстанавливающего количество лейкоцитов и тромбоцитов при химио- и радиотерапии ряда опухолевых заболеваний [27]. Высокоэффективен он и для повышения резистентности против широкой группы бактериальных и вирусных инфекций [27]. Самым активным липофильным производным мурамоилдипептида считают МТП-фосфатидилэтаноламид (*5u*), особенно при включение его в липосомы [22,28].

Японские исследователи предложили новый тип модификации мурамоилдипептида. Амидную группу изоглутамина в метиловом эфире 4,6-*O*-изопропилен-1-дезокси-МДП ацилировали хлорангидридами карбоновых кислот в присутствии 4-диметиламинопиридина. Последующее деблокирование дало гликопептиды (**6a-в**) [29].



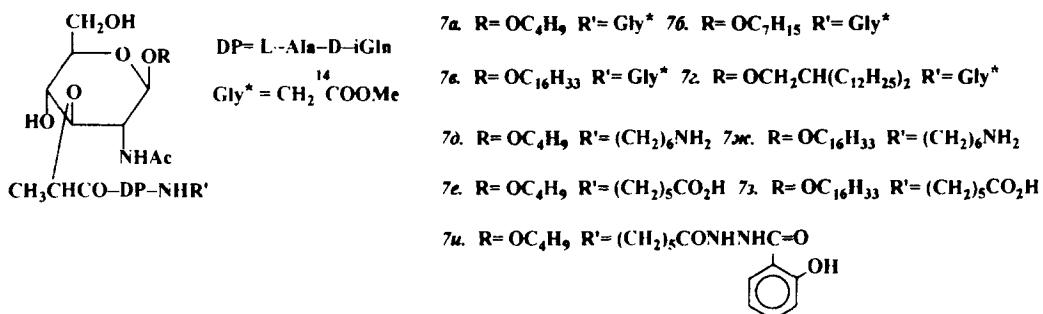
Карбоксильная группа изоглутамина была использована для конденсации с синтетическими олиго- и полипептидами такими как лизил-лизил-лизин [30] или мульти поли(DL-аланин)-поли(L-лизин). Такой «макромолекулярный» гликопептид по антиинфекционному действию в 100 раз превосходит мономер [31]. Причем конъюгация адьюванта с антигеном более эффективна по сравнению с действием смеси [32]. Совместная иммобилизация с пептидными антигенами позволила получить полностью синтетические вакцины, в частности против дифтерии, холеры и гепатита [22,33-35]. Наличие свободной аминогруппы в МДП-L-лизине (**4a**) позволяет проводить конъюгацию с пептидами, белками, ферментами и гормонами [36].

6-Н-Акрилоиламиногексаметиленамид МДП (**1к**) был применен для получения конъюгатов с полиакриламидом. Сополимеризация спейсерированного соединения (**1к**) с акриламидом дает возможность получить полимерные гликопептиды [17]. При введении в реакционную смесь углеводных или пептидных антигенов, содержащих спейсер с двойной связью, образуются синтетические неогликоконъюгаты [37].



В наших исследованиях мы использовали γ -карбоксильную группу молекулы МДП как для введения липофильного компонента (были синтезированы γ -октадециламид МДП (**1н**) [38] и 2-додецилтетрадециловый эфир МДП-глицина (**1o**) [39]), так и для получения изотопномеченых гликопептидов (**1п**, **7a-2**), необходимых для изучения механизма действия производных МДП [40,41]. В последнем случае метиловый эфир [$1-^{14}\text{C}$]-глицина конденсировали или с частично защищенным мурамоилдипептидом, или вначале получали меченный трипептид, который затем вводили в молекулы гликозидных аналогов МДП. С помощью меченых соединений (**7б,в**), в частности, был изучен транспорт гликопептидов через искусственные мембранны и оценена сорбция мурамоилдипептидов

опухолевыми клетками [42]. Высоколипофильное соединение (*1o*) наряду с высокой адьювантной активностью по отношению к белку gp160 ВИЧ-1 не увеличивает репликацию вируса, что делает его перспективным для исследований в качестве компонента анти-ВИЧ вакцины [43].



Октадециламид МДП (МДП-NC18) (*1h*) проявил высокую активность в тестах стимуляции продукции цитокинов (фактора некроза опухолей макрофагами и цитотоксических факторов спленоцитами, Рис.1) - веществ регулирующих иммунный ответ и способных к цитоцидному действию на опухолевые клетки [44].

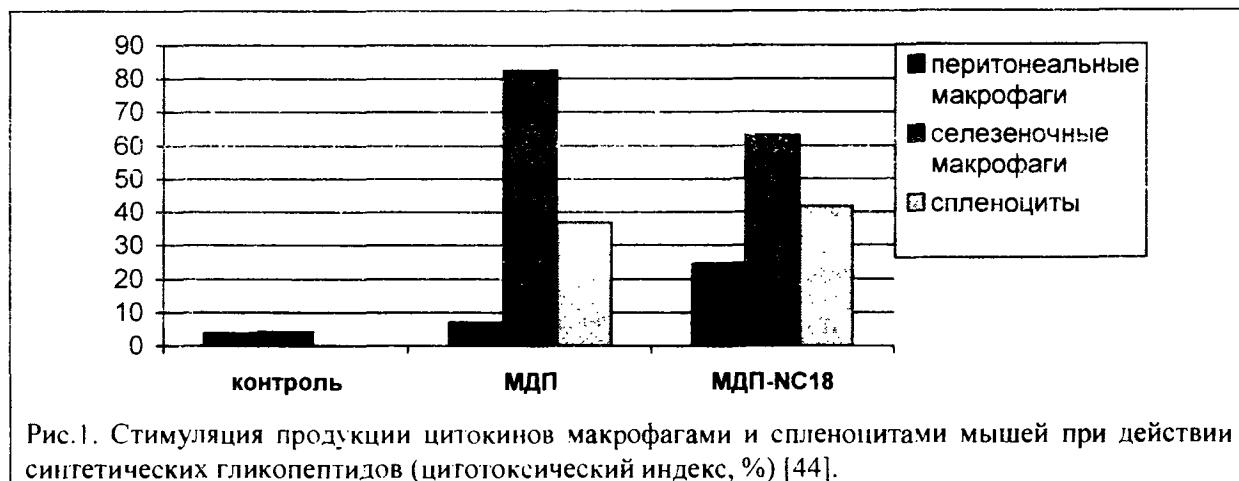
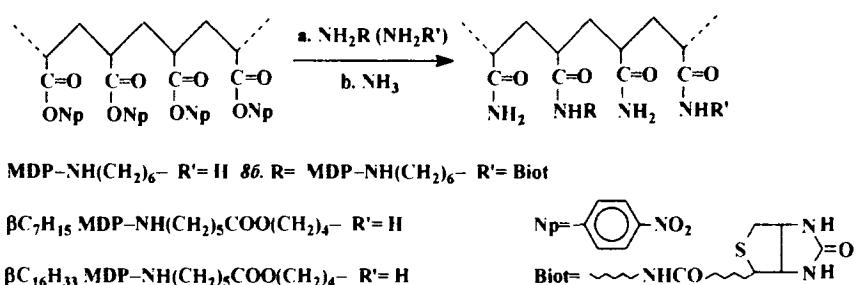
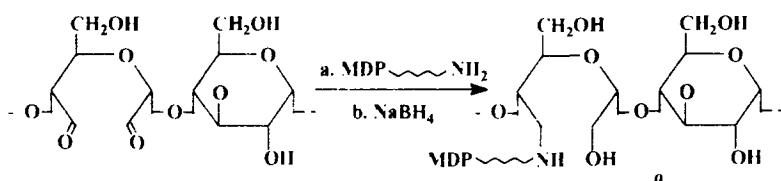


Рис.1. Стимуляция продукции цитокинов макрофагами и спленоцитами мышей при действии синтетических гликопептидов (цитотоксический индекс, %) [44].

С целью получения конъюгатов, содержащих мурамоилдипептид, нами, в частности, были синтезированы гликопептиды, имеющие по γ -карбоксильной группе изоглутамина спейсер с концевой амино- (*1p*) или карбоксильной (*1c*) функцией [45]. Спейсированный мурамоилдипептид (*1p*) был конденсирован с поли(4-нитрофенилакрилатом) по методу Бовина [46], что привело к конъюгату полиакриламида (ПАА) с МДП (*8a*).



Совместным действием на активированный полимер гликопептида (*1p*) и 6-аминогексиламида биотина получили биотинилированный полимерный зонд с МДП специфичностью (*8b*), необходимый для изучения механизмов рецепции мурамоилдипептидов с иммунными клетками. Альтернативно конденсацией соединения (*1p*) с диальдегид декстраном синтезировали «высокомолекулярный» гликопептид (**9**), обладающий способностью к биодеградации [41].



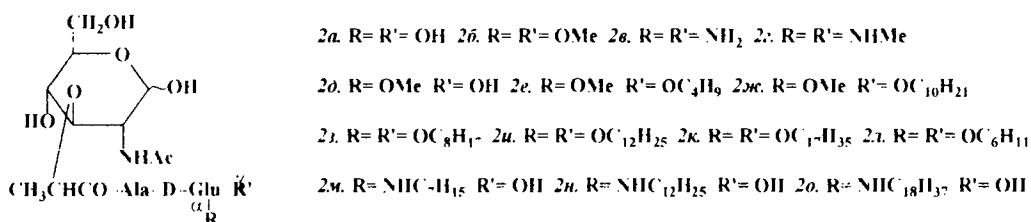
На основе β-бутил- и β-гексадецилмурамовых кислот были синтезированы спейсерированные по остатку изоглутамина гликопентилы с ω-амино- (*7d,ж*) и ω-карбоксильными (*7e,з*) группами [47]. Такие структуры с одной стороны обеспечивают высокое биологическое действие (β-алкилгликозиды МДП сравнимы по активности или даже превосходят сам мурамоилдипептид), с другой стороны исключается необходимость введения и удаления временной защиты аномерного гидроксила, становятся невозможными побочные реакции карбонильной группы углевода с аминофункцией, а также представляется возможным изменять за счет агликона липофильность конъюгатов. Так взаимодействием спейсерированных гликопентилов (*7d,ж*) с поли(4-нитрофенилацрилатом) были получены отличающиеся по липофильности конъюгаты ПАА с β-бутил- и β-гексадецилгликозидами МДП (*8в,г*) [47].

Наличие карбоксильной группы в спейсерированном гликопептиде (*7e*) позволило получить конъюгат МДП с биологически активной кислотой с использованием бифункционального соединения гидразина в качестве мостика. Конденсация кислоты (*7e*) с гидразидом салициловой кислоты под действием водорастворимого карбодиимида дала соединение (*7и*) [48].

Производные МДП по остатку глутаминовой кислоты.

Наличие двух карбоксильных функций в N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутаминовой кислоте (МДПК) позволило исследователям легко получить диметиловый эфир (*2б*) [2,7,8], диамид (*2в*) [7,8] и ди(метиламид) (*2г*) [8]. Французские ученые также синтезировали α-метиловый МДПК (*2д*) [19] и

несимметричные диэфиры МДПК: α -метиловый, γ -бутиловый (*2e*) и α -метиловый, γ -декиловый (*2ж*) [13].



Нами была предложена схема синтеза симметричных диэфиров МДПК, по которой были получены α,γ -диалкиловые эфиры МДПК (*2з-к*) [49], отличающиеся длиной алифатической цепи, а также дициклогексиловый эфир МДПК (*2т*). При изучении влияния гликопептидов на пролиферативную активность спленоцитов мышей диэфир (*2к*, МДПК(*C17*)₂) в малых дозах проявлял активность сравнимую с МДП [50] (Рис.2).

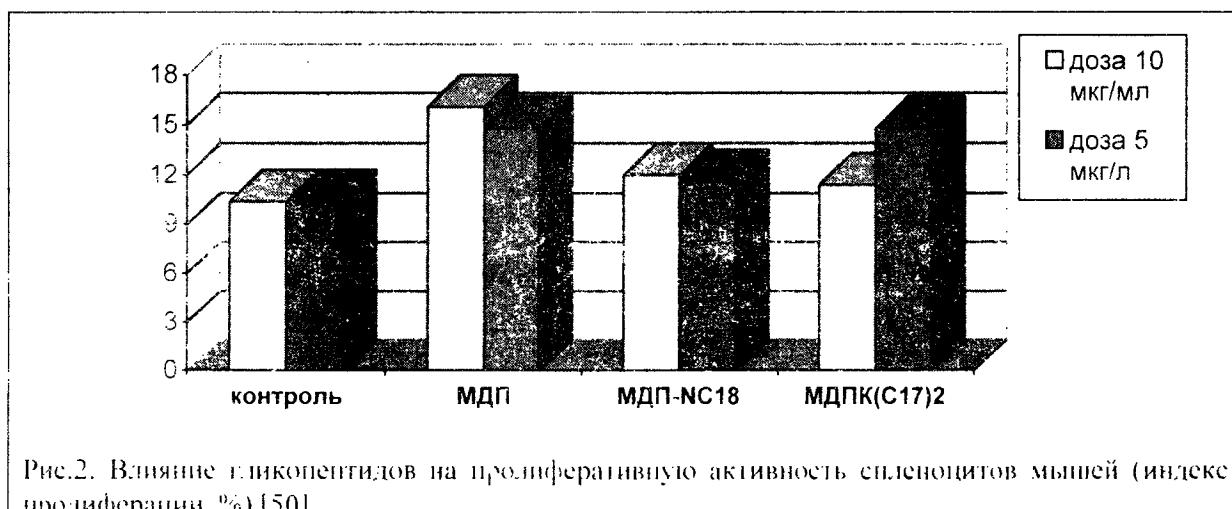
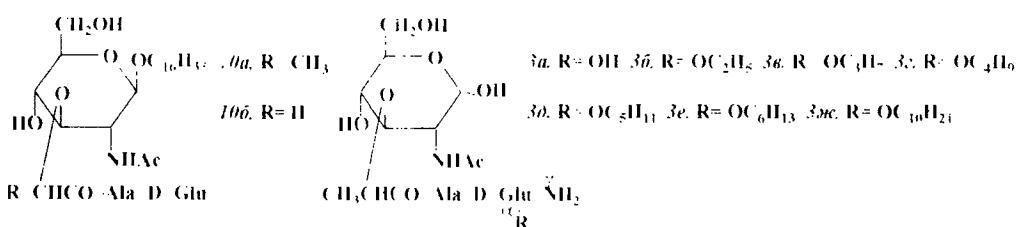


Рис.2. Влияние гликопептидов на пролиферативную активность спленоцитов мышей (индекс пролиферации, %) [50].

С целью упрощения схемы получения липофильных гликопептидов нами были синтезированы β -гексадецилгликозиды МДПК (*10а*) и пор-МДПК (*10б*) [51]. Используемый в этих синтезах дигензиловый эфир Вос-*L*-аланил-*D*-глутаминовой кислоты был получен из *D,L*-глутаминовой кислоты по разработанному нами методу, заключающемуся в конденсации рацемического дигензилового эфира глутаминовой кислоты с *n*-нитрофениловым эфиром Вос-*L*-аланина и разделения смеси диастереомеров кристаллизацией [52].



Нами также было предложено использовать α -карбоксильную группу остатка глутаминовой кислоты для введения липофильного компонента в виде алкиламида. Было синтезировано три α -алкиламида МДПК (**2и-о**), отличающиеся длиной алифатической цепи амида. Первоначально модификацию проводили действием алкиламинов на α -*n*-нитрофениловый, γ -бензиловый эфир Вос-*D*-глутаминовой кислоты, с последующим образованием дипептида и гликопептида [53]. По второму варианту γ -бензиловый эфир *D*-глутаминовой кислоты конденсировали с N-гидроксисукцинимидным эфиrom Вос-*L*-аланина, используя солевую защиту, а в полученном дипептиде свободную α -карбоксильную группу переводили в алкиламидную.

Производные МДП по остатку глутамина.

Наибольший интерес к производным МДП с глутамином в качестве С-концевой аминокислоты связан с наличием высокой адьювантной активности у соответствующих α -алкиловых эфиров (**3б-ж**) [12] и отсутствием у них пирогенности. Препарат этой группы «мурабутид» (**3г**) прошел 1 и 2 стадии клинических испытаний и нашел применение в качестве адьюванта в вакцинах против стрептококковых инфекций и столбняка [22].

Таким образом среди производных МДП по С-концевой аминокислоте к настоящему времени найдены эффективные препараты по всему спектру биологического действия мурамоилдипептидов: адьюванты для вакцин (МТП-РЕ, «мурабутид»), стимуляторы неспецифической антибактериальной резистентности (МТП-L18 – «ромуртид», МТП-глицерилмиколат), стимуляторы противоопухолевого иммунитета («ромуртид», МТП-Chol). По прежнему перспективным остается создание синтетических вакцин и содержащих МДП конъюгатов. Относительная простота модификации пептидной части молекулы гликопептида делает подобные структуры экономичными в синтезе и следовательно подходящими для препартивного получения.

Литература.

1. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* -1974.-V.59.-№4.-P.1317-1325
2. Adam A., Devys M., Souvannavong V., et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* -1976.-V.72.-№1.-P.339-346
3. Kotani S., Watanabe Y., Kinoshita F., et al. *Biken J.* -1977.-V.20.-№2.-P.39-45
4. Nagai Y., Akiyama K., Kotani S., et al. *Cell. Immun.* -1978.-V.35.-P.168-172
5. Azuma I., Kamisango K., Saiki I., et al. *Infect. Immun.* -1980.-V.29.-№3.-P.1193-1196
6. Kobayashi S., Fukuda T., Yukimasa H., et al *Bull. Chem. Soc. Jap.* -1980.-V.53.-№9.-P.2570-2577
7. Kamisango K., Saiki I., Tanio Y., et al. *Chem. Pharm. Bull.* -1981.-V.29.-№6.-P.1644-1654

8. Lefrancier P., Choay J., Derrien M., Lederman I. *Int. J. Peptide Protein Res.*-1977.-V.9.-P.249-257
9. Schwartzman S.M., Ribi E. *Prep. Biochem.*-1980.-V.10.-№3.-P.255-267
10. Chaturvedi N.C., Khosla M.C., Anand N. *J. Med. Chem.*-1966.-V.9.-№11.-P.971-973
11. Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K., Shiba T. *Bull. Chem. Soc. Jap.*-1976.-V.49.-№2.-P.533-539
12. Lefrancier P., Derrien M., Jamet X., et al. *J. Med. Chem.*-1982.-V.25.-№1.-P.87-90
13. Lefrancier P., Petitou M., Level M., et al. *Int. J. Peptide Protein Res.*-1979.-V.14.-№5.-P.437-444
14. Kotani S., Kinoshita F., Watanabe Y., et al. *Biken J.*-1977.-V.20.-№3-4.-P.125-130
15. Haq W., Rizvi S.Y., Kapil A., et al. *Ind. J. Chem. B.*-1990.-V.29.-№3.-P.-263-267
16. Uemiya M., Saiki I., Kusama T., et al. *Microbiol. Immunol.*-1979.-V.23.-№8.-P.821-823
17. Хорлин А.Я., Абашев Ю.П. *Биоорган. химия.*-1984.-Т.10.-№8.-С.1119-1126
18. Богослов О.В., Головкина И.В., Швец В.И., Бовин Н.В. *Биоорган. химия.*-1993.-Т.19.-№2.-С.190-196
19. Lefrancier P., Derrien M., Lederman I., et al. *Int. J. Peptide Protein Res.*-1978.-V.11.-P.289-296
20. Shida T., Kotani S., Yamamura Y., et al. Нат. 4317771 США. РЖ Химия.-1983.-7О19П
21. Tenu J.P., Bernard I.M., Petit J.F., Philips N. Пат. 2557758 Франция. *Chem. Abstr.*-1986.-V.104.-19825k
22. Baschang G. *Tetrahedron.*-1989.-V.45.-№20.-P.6331-6360
23. Tenu J.P., Clemance M., Level M., et al. *C. R. Acad. Sci. Paris.*-1989.-T.308.-№11.-P.991-995
24. Parant M.A., Audibert F.M., Chedid L.A., et al. *Infect. Immun.*-1980.-V.27.-№3.-P.826-831
25. Barratt G.M., Yu W.P., Fessi H., et al. *Cancer J.*-1989.-V.2.-№12.-P.439-443
26. Yu W.P., Barratt G.M., Devissaguet J.-Ph., Puisieux F. *Int. J. Immunopharmac.*-1991.-V.13.-№2-3.-P.167-173
27. Sosnowska D., Dzierzbicka K., Myiliwski A., Koodziejczyk A.M. *Postepy Hig. Med. Dosw.*-1992.-V.42.-№5.-P.521-530
28. Sone S., Matsuura S., Ogawara M., Tsubura E. *J. Immunol.*-1984.-V.132.-№4.-P.2105-2110
29. Hasegawa A., Seki E., Kiso M., Azuma I. *Agr. Biol. Chem.*-1986.-V.50.-№8.-P.2137-2139
30. Audibert F., Parant M., Damais C., et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*-1980.-V.96.-P.915-923
31. Chedid L., Parant M., Parant F., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1979.-V.76.-№12.-P.6557-6561
32. Mozes E., Sela M., Chedid L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1980.-V.77.-№8.-P.4933-4937
33. Audibert F., Jolivet M., Chedid L.A., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1982.-V.79.-№8.-P.5042-5046
34. Jacob C.O., Arnon R., Sela M. *Immunol. Lett.*-1986.-V.14.-P.43-48
35. Maćkiewicz Z., Świderska H., Kalmanowa M., et al. *Collect. Czech. Chem. Commun.*-1992.-V.57.-P.204-211

- 36.Audibert F., Carelli C., Chedid L.A., et al. Заявка 2522967 Франция. РЖ Химия.-1985.-12O22П
- 37.Юровский В.В., Бовин Н.В., Сафонова Н.Г. и др. Биоорган. химия.-1986.-Т.12.-№1.-С.100-105
- 38.Земляков А.Е., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1988.-№6.-С.892-893
- 39.Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. Биоорган. химия.-1994.-Т.20.-№4.-С.439-447
- 40.Земляков А.Е., Андрякова И.М., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1990.-№2.-С.245-248
- 41.Кур'янов В.О. Синтез похідних мурамоїлдіпептиду: ліпоглікопептиди та кон'югаты. Автореф. диссерт... канд. хим. наук. Одесса, 1995.-24с
- 42.Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Fuchs B.B. Int. J. Immunopharmacac.-1996.-V.18.-№11.-P.651-659
- 43.Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaja I.B., Hinkula J., et al. Vaccine.-1997.-V.15.-№12/13.-P.1479-1486
- 44.Рахмилевич А.Л., Мигдал Т.Л., Рахимова М.С. и др. Антибиотики и химиотерапия.-1989.-Т.-34.-№ 11.-С.836-839
- 45.Курьянов В.О., Желобецкая Т.Ф., Земляков А.Е., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1993.-№1.-С.122-125
- 46.Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., et al. Glycoconjugate J.-1993.-V.10.-P.142-151
- 47.Курьянов В.О., Цикалов В.В.. Земляков А.Е.. Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1994.-№3.-С.424-429
- 48.Земляков А.Е., Курьянов В.О., Цикарова В.Н.. Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1997.-№5.-С.731-734
- 49.Терехов В.В., Земляков А.Е., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1991.-№1.-С.101-105
- 50.Медведев А.Э., Фукс Б.Б., Бовин Н.В., Земляков А.Е. Бюлл. экспер. биол.-1992.-№12.-С.626-628
- 51.Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1991.-№4.-С.553-557
- 52.Земляков А.Е., Потеев Д.А., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1991.-№6.-С.865-866
- 53.Земляков А.Е., Терехов В.В., Чирва В.Я. Химия природн. соедин.-1990.-№ 2.-С.249-252